



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 159**

51 Int. Cl.:

C12N 9/74 (2006.01)

C12N 9/62 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97946594 .5**

86 Fecha de presentación : **07.11.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0946715**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.1999**

54 Título: **Uso de una proteína C modificada.**

30 Prioridad: **08.11.1996 US 745254**
25.07.1997 US 53768 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2007

73 Titular/es: **Oklahoma Medical Research Foundation**
825 N.E. 13th Street
Oklahoma City, Oklahoma 73104, US

72 Inventor/es: **Esmon, Charles, T. y**
Smirnov, Mikhail

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 265 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de una proteína C modificada.

5 **Contexto de la invención**

La presente invención está, en general, en el área del uso de una proteína C modificada que posee actividad anticoagulante aumentada para tratar a enfermos del Factor V de Leiden.

10 El gobierno de los Estados Unidos posee ciertos derechos sobre esta invención, en virtud de la concesión No. P50 54502, otorgada por el Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre de los Institutos Nacionales de Salud a Naomi Esmon.

15 La proteína C desempeña un papel importante en la regulación de la coagulación sanguínea. Los enfermos con deficiencia de proteína C usualmente muestran complicaciones tromboticas con amenaza para la vida en la infancia (Selighson *et al.*, (1984) *N. Engl. J. Med.*, **310**, 559-562; Esmon, (1992) *Trends Cardiovasc. Med.* **2**, 214-220) que son corregidas mediante la administración de proteína C (Dreyfus *et al.*, (1991) *N. Engl. J. Med.*, **325**, 1565-1568). Además, la proteína C activada (APC) puede evitar los efectos letales que provoca *E. coli* en modelos de sepsis gram negativa en babuinos (Taylor *et al.*, (1987) *J. Clin. Invest.*, **79**; Patente de Estados Unidos No. 5.009.889, a Taylor y Esmon) y resultados clínicos preliminares sugieren que la proteína C es eficaz en el tratamiento de ciertas formas de shock séptico en humanos (Gerson *et al.*, (1993) *Pediatrics* **91**, 418-422). Estos resultados sugieren que la proteína C puede al mismo tiempo controlar la coagulación e influir sobre la inflamación. De hecho, la inhibición de la proteína S, un componente importante de la vía de la proteína C, exacerba la respuesta de los primates a niveles subletales de *E. coli* e incrementa la aparición de TNF en la circulación (Taylor *et al.*, (1991) *Blood*, **78**, 357-363). Aun sedesconoce 25 el mecanismo involucrado en el control de la respuesta inflamatoria.

La proteína C se activa cuando la trombina, la enzima terminal del sistema de la coagulación, se une a una proteína de la superficie celular del endotelio, la trombomodulina (Esmon, (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4743-4746; Dittman y Majerus, (1990) *Blood* **75**, 329-336; Dittman, (1991) *Trends Cardiovasc. Med.* **1**, 331-336). En células en cultivo, 30 la transcripción de la trombomodulina es bloqueada mediante la exposición de las células endoteliales al factor de necrosis tumoral (TNF) (Conway y Rosenberg, (1998) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5588-5592) y la actividad de la trombomodulina y los antígenos son a continuación internalizados y degradados (Lentz *et al.*, (1991) *Blood* **77**, 543-550, Moore, K.L., *et al.*, (1989) *Blood* **73**, 159-165). Además, C4bBP, una proteína reguladora del sistema del complemento se une a la proteína S para formar un complejo que es funcionalmente inactivo en el apoyo a la actividad anticoagulante APC *in vitro* (Dahlbäck, (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12022-12027) e *in vivo* (Taylor *et al.*, 1991). Más aun, C4bBP se 35 comporta como un reactivo de fase agudo (Dahlbäck, (1991) *Tromb. Haemostas.* **66**, 49-61). Por tanto, aparentemente, las proteínas de esta vía no solo regulan la inflamación, sino que también interactúan con componentes que regulan la inflamación y están, a su vez, sometidas a regulación negativa por parte de mediadores de la inflamación.

40 Smirnov *et al* (1996) *Circulation* **94**, 1-694 plantea que la dependencia de PE que muestra la función de la proteína C activada se encuentra mediada por el dominio Gla.

Por tanto, constituye un objetivo de la presente invención proporcionar una proteína C modificada que sea útil como anticoagulante mejorado.

45 Constituye un objetivo adicional de la presente invención proporcionar usos de una proteína C modificada, como se plantea en las reivindicaciones.

Constituye otro objetivo de esta invención proporcionar métodos para la modulación de la respuesta inflamatoria que involucren a la proteína C y a la proteína C activada.

Resumen de la invención

55 Se pueden construir moléculas de Proteína C modificadas con la sustitución de la región del ácido gammacarboxilglutámico (Gla) nativa de la Proteína C por la de otra proteína dependiente de vitamina K, con mayor preferencia, la protrombina. La proteína C modificada o quimérica presenta ventajas sobre la proteína C de tipo salvaje, ya que es menos sensible a la inhibición por algunos anticuerpos naturales inhibidores de la proteína C (que podrían, de otro modo, disminuir la capacidad de la proteína C de actuar como anticoagulante) y no necesita los mismos cofactores o la misma cantidad de cofactores y, por tanto, puede ser efectiva en pacientes que presentan niveles bajos de cofactores 60 tales como la proteína S o los lípidos que se encuentran en niveles elevados en las plaquetas activadas, tales como la fosfatidil etanolamina (PE).

Como se describe en los ejemplos, se diseñó una proteína C quimérica después de observar que la suplementación de vesículas con contenido de fosfatidilserina (PS) con PE incrementa la actividad anticoagulante de la proteína C activada (APC). Para determinar las bases estructurales de la sensibilidad a PE, se construyó una molécula quimérica en la cual se reemplazó el dominio Gla y el apilamiento hidrofóbico (residuos 1-45) de la proteína C por la región correspondiente de la protrombina (PC-PT Gla). La molécula quimérica activa es denominada APC-PT Gla. Se incrementó por un factor de 10 la inactivación APC del factor Va mediante PE, y por un factor de 2 mediante la proteína 65

S, tanto en presencia como en ausencia de PE. En los sistemas purificados, la APC de tipo salvaje, con respecto a la quimera, inactivó el factor Va con más rapidez en vesículas que contenían PE y con más lentitud en vesículas que carecían de PE. Con la APC-PT Gla, la inactivación del factor Va se incrementó solo ligeramente por el PE y fue ligeramente inhibida por la proteína S. La protrombina inhibió la inactivación del factor Va mediante la APC de tipo salvaje de modo mucho más efectivo que la quimera, lo cual posiblemente explica la observación de que la quimera exhibió aproximadamente cinco veces más actividad anticoagulante plasmática que la APC de tipo salvaje bajo todas las condiciones ensayadas. Estos resultados demuestran que la influencia funcional de la PE sobre la inactivación del factor Va mediante la APC está mediada por propiedades especiales que son únicas del dominio Gla y que el dominio Gla de la proteína C proporciona funciones especializadas para incrementar grandemente la interacción con el factor Va y la proteína S en membranas que contienen PE.

Adicionalmente, se probó la actividad anticoagulante de la quimera en plasma normal y plasma de Leiden con factor V. Se monitoreó el incremento en el tiempo de coagulación, como función del aumento de APC o la concentración de quimera. Como muestran las figuras que se incluyen, con la quimera, el tiempo de coagulación aumentó de manera prácticamente lineal desde 23 segundos sin APC, hasta 45 segundos con APC a un microgramo/ml. En contraste, fueron necesarios 10 microgramos/ml de APC nativa para producir una respuesta anticoagulante comparable en el plasma de Leiden. A diferencia de lo que ocurre con la proteína C activada, la actividad anticoagulante fue independiente de la proteína S.

20 Breve descripción de la figuras

La figura 1 es un gráfico que representa las actividades anticoagulantes de la APC y la APC-PT Gla. Se plotea el tiempo de coagulación (en segundos) contra la concentración de enzima (microgramos/ml) para la APC-PT Gla en presencia de PE:PS:PC (cuadrados vacíos); APC-PT Gla en presencia de PS:PC (bloques rellenos); APC en presencia de PE:PS:PC (círculos vacíos); y APC en presencia de PS:PC (círculos rellenos).

Las figuras 2A y 2B son gráficos que muestran la influencia de un anticuerpo contra la proteína S, anti proteína S MAB S155, sobre la actividad de la APC de tipo salvaje y la APC-PT Gla en plasma normal, ploteando el tiempo de coagulación (en segundos) contra la concentración de APC o APC-PT Gla (microgramos/ml). En la figura 2A se gráfica la actividad de la APC y APC-PT Gla a concentraciones que oscilan entre 0 y 0.5 microgramos/ml; la figura 2B constituye una visión expandida de las actividades a concentraciones que oscilan entre 0 y 0.1 microgramos/ml. La APC de tipo salvaje en combinación con PE, sin mAb (círculos rellenos); APC de tipo salvaje en combinación con PS y anti proteína S mAb (sin proteína S) (triángulos vacíos); APC de tipo salvaje en combinación con PE y anti proteína S mAb (triángulos rellenos); APC-PT Gla en combinación con PE, sin mAb (triángulos invertidos rellenos); APC-PT Gla en combinación con PS, anti proteína S mAb (diamantes vacíos); y APC-PT Gla en combinación con PE, y anti proteína S mAb (diamantes rellenos).

Las figuras 3A y 3B son gráficos que comparan la actividad relativa de la APC de tipo salvaje en combinación con PS:PC, PC-PT Gla en combinación con PS:PC, APC de tipo salvaje en combinación con PE:PS:PC, y PC-PT Gla en combinación con PE:PS:PC, en presencia (Figura 3B) y ausencia (Figura 3A) de protrombina a una concentración fisiológica de 1.4 micromolar. La concentración de APC requerida en la presencia de proteína S y vesículas sin PE se define como uno. Se calcula la actividad relativa como la concentración que se requiere, bajo condiciones estándar, para inhibir 50% de la actividad en 30 minutos, dividida por la concentración que se requiere, bajo condiciones experimentales, para inhibir 50% de la actividad en 30 minutos.

La figura 4 es un gráfico de los tiempos de coagulación que muestra la actividad de la APC de tipo salvaje y la APC-PT Gla en plasma normal y plasma de Leiden con factor V, comparando la actividad a concentraciones de APC de hasta diez microgramos/ml.

50 Descripción detallada de la invención

El ensamblaje de complejos enzimáticos multiproteicos sobre las superficies de membrana fosfolipídica cargada negativamente es esencial tanto para la formación como la regulación del proceso de coagulación de la sangre. La activación de los zimógenos ocurre rápidamente cuando la enzima, usualmente una proteína dependiente de vitamina K, se une a un cofactor, usualmente una proteína no dependiente de vitamina K, para activar un sustrato, usualmente una proteína dependiente de vitamina K (revisado en Mann *et al.* (1998) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 915-956; Furie y Furie (1998) *Cell* **53**, 505-518). Las enzimas y los sustratos interactúan con la membrana de manera reversible, mientras que los cofactores pueden unirse de manera reversible o ser proteínas integrales de membrana. La naturaleza del grupo de la cabeza del fosfolípido, aparentemente, contribuye a la eficiencia catalítica y de afinidad, siendo generalmente aceptado que la fosfatidilserina (PS) es el fosfolípido más importante (Mann *et al.* (1998); Pei *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3226-3233). La inmensa mayoría de los estudios biofísicos y cinéticos del ensamblaje de los complejos dependientes de vitamina K han utilizado membranas compuestas únicamente de fosfatidilcolina (PC) y PS (Mann *et al.*, Pei *et al.*, Castellino, F.J. (1995) *Trends Cardiovasc. Med.* **55-62**; Nelsestuen, (1978) *Biochemistry* **17**, 2134-2138).

Recientemente se ha observado que la fosfatidil etanolamina (PE), un constituyente importante de la monocapa externa de la membrana de las plaquetas activadas (Bevers, E.M., Comfurius, P., y Zwaal, R.F.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **736**, 57-66), desempeña un papel importante en el funcionamiento de uno de estos complejos, la inacti-

vación dependiente de la proteína C activada (APC) del factor Va (Smirnov y Esmon (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 816-819). En este caso, la presencia de PE o cardiolipina incrementa de manera potente la velocidad de inactivación. Con posterioridad, se han reportado funciones para la PE en la unión del factor VIII (Gilbert y Arena (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18500-18505), la activación factor de tejido-factor VIIa del factor X (Neuenschwander, *et al.* (1995) *Biochemistry* **34**, 13988-13993) y la activación de la protrombina (Billy *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26883-26889; Smeets *et al.* (1996) *Thromb. Res.* **81**, 419-426). En el caso de la activación de la protrombina, con PE presente, la cantidad de PS que se requiere para apoyar la activación de la protrombina se redujo varias veces. En el caso del factor de tejido, se demostró que la presencia de PE incrementó la activación, en primera instancia, mediante una disminución de la cantidad de PS requerida para la activación óptima y se trataba, sobre todo, de un efecto de Km sobre el sustrato. El impacto de la PE sobre la inactivación del factor Va fue sustancialmente superior al que tuvo sobre los otros sistemas. Para la activación de la protrombina y la activación del factor X mediada por el factor de tejido, el aumento debido a la PE pudo anularse sencillamente mediante el aumento de la concentración de PS, mientras que el impacto de la PE sobre la inactivación del factor Va no fue eliminado por la elevada concentración de PS (Smirnov 1994).

La proteína C, como el resto de las proteínas dependientes de vitamina K está compuesta por varios dominios (Furie 1988). Los mismos incluyen el dominio proteasa, dos dominios de tipo EGF, un apilamiento aromático y el dominio Gla dependiente de vitamina K, que contiene los residuos de ácido 4-carboxiglutámico (Gla). Estos residuos de Gla están involucrados en la unión a la membrana dependiente de Ca^{2+} y se encuentran agrupados en los 48 residuos del extremo amino terminal de los factores del plasma dependientes de vitamina K (Furie 1988, Castellino 1995, Mann, K.G., Krishnaswamy, S., y Lawson, J.H. (1992) *Sem. Hematol.* **29**, 213-226). Las secuencias de estas proteínas correspondientes a dicha región se encuentran altamente conservadas, pero el número de residuos de Gla varía entre 9 y 12 (Furie 1988). Dado que los dominios Gla están involucrados en la unión a la membrana y la actividad catalítica dependiente de la membrana, se ha postulado que las diferencias en el comportamiento dependiente de PE entre la proteína C y los otros complejos pueden estar mediadas por los dominios Gla. Para probar esta posibilidad, se diseñó una forma quimérica de la proteína C en la cual el dominio Gla se había intercambiado con el de la protrombina, en un esfuerzo para evaluar las regiones de las moléculas que están involucradas en las actividades dependientes de PE.

Se diseñó la quimera, de manera que no fuese inmunogénica para humanos y, al mismo tiempo, que tuviese las propiedades demostradas en los ejemplos. Se remplazaron los exones del uno al tres de la proteína C por los exones del uno al tres de la protrombina. Los exones del uno al tres codifican para un preproliferador de aproximadamente 42 aminoácidos que incluye un péptido señal requerido para el anclaje apropiado de la proteína en la carboxilasa que carboxila el dominio Gla y que se encuentra escindido en la proteína madura, el dominio Gla que consta de aproximadamente 32 aminoácidos y la región del apilamiento aromático, que se extiende entre los residuos 39 y 42 en la protrombina humana. Los sitios de splicing de la proteína C y la protrombina son idénticos, de manera que no se requirieron cambios de secuencia y solo la secuencia humana que aparece en las proteínas humanas naturales está presente en las quimeras. El sitio de activación en el cimógeno de la proteína C no fue afectado por el cambio.

Los resultados de los estudios reportados anteriormente muestran que la sustitución del dominio Gla nativo por el dominio Gla de la protrombina altera la actividad de la proteína C, disminuyendo la necesidad de la presencia de PE y proteína S, y reduciendo la inhibición por protrombina. La dependencia de PE de la actividad anticoagulante de la APC se encuentra claramente mediada, en gran medida, por el dominio Gla de la proteína C. APC-PT Gla mostró poca dependencia con respecto a la presencia de PE en los liposomas, en sistemas purificados. Más aun, la actividad inactivadora del factor Va de la quimera fue inhibida, en lugar de ser estimulada por la proteína S. Tales diferencias no se debieron a defectos en la unión a la membrana, ya que la quimera se unió a la membrana, al menos tan bien como la proteína C de tipo salvaje y fue mas activa que las vesículas de tipo salvaje carentes de PE, mientras que fue ligeramente menos activa en vesículas que contenían PE. Gran parte de esta diferencia, aparentemente se encuentra en la capacidad de la proteína S y el factor Va de aumentar de manera sinérgica la unión de APC a vesículas, especialmente las que contienen PE. En particular, en presencia del factor Va, la proteína S no consigue aumentar la unión de la quimera como lo hace en el caso de la APC de tipo salvaje.

En el plasma, la quimera mostró una actividad anticoagulante mucho mayor que la APC de tipo salvaje en vesículas con o sin PE. Estas diferencias aparentemente se debieron, en parte, a la disminución de la actividad de la protrombina para bloquear la inactivación del factor Va por parte de la quimera.

Los efectos del PE sobre la catálisis de los complejos APG anticoagulante tienen ramificaciones tanto para la biología celular como para la fisiopatología. Se ha reportado que el PE se presenta en las superficies de células inactivadas (Wang *et al.*, 1986 *Biochem. Biophys. Acta* **856**, 244-258) y, después de la activación, puede constituir cerca de 40% de los fosfolípidos de la monocapa externa (Bever, *et al.*, 1983). Además, se ha reportado que el PE tiene una KM mayor para la flipasa y, por tanto, es probable que se transporte más lentamente hacia la monocapa interna de la membrana (Devaux, 1991 *Biochemistry* **30**, 1163-1173). Por tanto, si los diferentes complejos de coagulación exhiben distintas dependencias PE:PS, este cambio temporal de la composición de la membrana puede favorecer, selectivamente, las reacciones de inhibición de la coagulación o de activación de la coagulación.

Aunque se demostró mediante la sustitución de la región Gla de la proteína C por la región Gla de la protrombina, muchos de los otros factores de coagulación dependientes de vitamina K son igualmente conocidos, y se podría haber usado sus regiones Gla para insertarlas en lugar de la región N-terminal de la proteína C, para crear una quimera con actividad anticoagulante alterada. Más aun, aunque la quimera descrita en los ejemplos se construyó mediante la sustitución de los exones uno, dos y tres de la protrombina en lugar de los de la proteína C, se podría, realmente,

sustituir solo una porción de la proteína codificada por dichos exones. Por ejemplo, podría sustituirse solo el dominio Gla de la protrombina en lugar del dominio de la proteína C, o solo los dominios Gla y el apilamiento helicoidal, ya que se espera que la presencia del preprolídido de la proteína C resulte en la carboxilación de la región Gla. A diferencia de otros sistemas, el sistema de la coagulación es altamente predecible, sobre la base de resultados *in vitro*, y la elevada conservación de la estructura entre las proteínas de la coagulación proporciona un medio para realizar extrapolaciones de una proteína a otra. Otras proteínas donantes representativas incluyen al factor X y el factor VII. Las quimeras se construyen utilizando las mismas técnicas descritas en detalle en el ejemplo. Las secuencias de ADN que codifican para los otros factores de coagulación dependientes de vitamina K son conocidas y se encuentran descritas en la literatura.

Composiciones farmacéuticas

La proteína es generalmente efectiva cuando se administra por vía parenteral en cantidades superiores a 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, asumiendo 35 ml plasma/kg, aproximadamente de tres a cuatro microgramos de proteína C/ml de plasma, y de uno a tres microgramos de proteína C quimérica/ml de plasma. Sobre la base de la extrapolación realizada a partir de otras proteínas, para el tratamiento de la mayoría de los desórdenes inflamatorios, el rango de las dosis se encontrará entre 20 y 200 microgramos/kg de peso corporal.

La proteína C modificada se administra, preferencialmente, a través de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las personas versadas en la técnica conocen vehículos farmacéuticos adecuados. Para la administración parenteral, el compuesto debe suspenderse, usualmente, en agua o solución salina estériles. La forma activa de la quimera puede ser un agente preferible en el tratamiento de desórdenes particulares.

Desórdenes a tratar

Debe ser posible tratar, con la proteína C modificada, desórdenes en los cuales la proteína S es baja, algunas formas de lupus, que se manifiestan después de apoplejías o infartos del miocardio, después de la trombosis venosa, y en la coagulación intravascular diseminada, el shock séptico, el síndrome de deficiencia respiratoria en adultos, y la embolia pulmonar. En estas condiciones, los niveles de la proteína S son usualmente bajos, provocando que la APC sea menos efectiva como anticoagulante (ver D'Angelo *et al.*, 1989 *J. Clin. Invest.* 81, 1445-1454). Ejemplos de estas enfermedades incluyen la coagulación intravascular diseminada, durante el tratamiento anticoagulante con warfarina, y en la enfermedad trombohemolítica. Dado que la actividad óptima de la quimera no depende de los niveles normales de la proteína S en el paciente, se espera que sea un anticoagulante activo en enfermedades en las que se encuentre afectada la proteína C activada propia del paciente, o la proteína C administrada terapéuticamente, o la proteína C activada. Nótese que por razones técnicas, no se han preparado satisfactoriamente concentrados de proteína C útiles para el tratamiento.

Los anticoagulantes del Lupus y algunos anticuerpos anti fosfolípidos bloquean la función de los complejos de coagulación y anticoagulación, preferentemente en membranas que contienen PE (Smirnov *et al.*, 1995 *J. Clin. Invest.* 95, 309-316; Rauch *et al.*, 1986 *J. Biol. Chem.* 261, 9672-9677). Estos anticuerpos se encuentran asociados a un riesgo elevado de trombosis (Ginsberg *et al.*, 1993 *Blood* 81, 2958-2963; Triplett, D.A., 1993 *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117, 78-88; Pierangeli *et al.*, 1994 *Thromb. Haemostas.* 71, 670-674). Además de las aplicaciones terapéuticas, la molécula de APC sin dependencia de PE permite explorar los mecanismos de los efectos anticoagulantes del lupus dependientes de PE sobre el sistema APC *in vitro* e *in vivo*. La quimera es menos sensible a la inhibición por parte de los efectos anticoagulantes del lupus y, por tanto, puede utilizarse para identificar poblaciones de anticuerpos patogénicos que reaccionan con la proteína C.

También es posible tratar a pacientes con factor V de Leiden utilizando la proteína C quimérica. El factor V de Leiden es un polimorfismo relativamente común (aproximadamente 5% de la población) entre los caucásicos que aparece por la sustitución de Gln por Arg en el residuo 506 de la molécula del factor Va, descrito en Dahlbäck, "Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism" *Blood* 85, 607-614 (1995). Esta forma del factor Va es resistente a la inactivación por APC y frecuentemente se le llama factor V de Leiden, porque el sitio de la mutación fue identificado originalmente por el grupo de Leiden, como reportan Bertina *et al.*, "Mutation in blood coagulation factor V associated to activated protein C" *Nature* 369, 64-67 (1994). Dicho residuo de Arg es uno de los sitios de corte utilizados por la APC para inactivar al factor Va, como se describe en Kalafatis *et al.*, "The mechanism for inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C" *J. Biol. Chem.* 269, 31869-31880 (1994); Kalafatis *et al.*, "Characterization of the molecular defect in factor VR506Q" *J. Biol. Chem.*, 270, 4053-4057 (1995). El factor V de Leiden es un factor de riesgo para la trombosis venosa y estudios clínicos han indicado que el polimorfismo se encuentra en alrededor de 20-60% de los pacientes con trombosis profunda de vena, como reportan Florell *et al.*, "Inherited thrombotic disorders: An Update" *Am. J. Hematol* 54, 53-60 (1997). Dado que el polimorfismo es tan común, sería una ventaja tener la posibilidad de inactivar al factor V de Leiden con mayor rapidez, para evitar la trombosis. Esto es especialmente cierto si la proteína C o APC se utilizaran en la terapia trombótica.

La dosis efectiva de la proteína C quimérica o su forma activada puede extrapolarse de los estudios clínicos que usan la proteína C (tipo salvaje) modificada a la luz de las diferencias en actividad que se mostraron en los ejemplos.

ES 2 265 159 T3

La presente invención será comprendida con más claridad en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. En ellos se utilizan las abreviaturas siguientes: APC (proteína C activada); PC-PT Gla, una molécula quimérica en la cual el dominio Gla y el apilamiento hidrofóbico (residuos 1-45) de la proteína C han sido remplazados por la región correspondiente de la protrombina; APC-PT Gla, la forma activada de PC-PT Gla; PE, fosfatidil etanolamina; PS fosfatidilserina; PC, fosfatidilcolina; Gla, ácido 4-carboxiglutámico; X-CP, activador del factor X proveniente del veneno de víbora de Russell; BSA, albúmina de suero bovino; TBS, NaCL 150 mM, Tris-HCl 20 mM, azida de sodio 0,02%, pH 7.4; TBS-GOB, TBS que contiene 1 mg/ml de gelatina, 1 mg/ml de ovoalbúmina y 10 mg/ml de BSA.

Ejemplo 1

Construcción de una proteína quimérica Proteína C-Protrombina

Procedimientos experimentales

Proteínas y reactivos: Se prepararon como está descrito la trombina y protrombina humanas (Owen *et al.*, 1974 *J. Biol. Chem.* **249**, 594-605), la APC humana (Esmon *et al.*, 1993 *Meths. Enzymol.* **222**, 359-385), la proteína S humana (Taylor *et al.*, 1991 *Blood* **78**, 356-363), el factor Xa humano (Le Bonniec *et al.*, 1994 *J. Biol. Chem.* **267**, 6970-6976), el factor Va bovino (Esmon, C.T., 1973 *J. Biol. Chem.* **254**, 964-973), y el activador del factor X de veneno de víbora de Russell (X-CP) (Esmon, C.T., 1973, Disertación doctoral, Universidad de Washington, St. Louis). Se preparó meizotrombina marcada en el sitio activo con fluoresceína, como se describe en Armstrong *et al.*, 1990 *J. Biol. Chem.* **265**, 6210-6218; Bock, 1988 *Biochemistry* **27**, 6633-6639. Se obtuvo el factor Va humano de Hematologic Technologies. La albúmina de suero bovino (BSA), el veneno de víbora de Russell, la ovoalbúmina, la gelatina, el MOPS, el Tris-HCl y las sales se obtuvieron de Sigma. Los sustratos cromogénicos Spectrozime TH y Spectrozime Pca se obtuvieron de American Diagnostica (Greenwich, CT). El inhibidor irreversible de serín-proteasas (p-amidinofenil)-metanosulfonil fluoruro se obtuvo de Calbiochem. El 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3 PS, el 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3 PC y el 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3 PE se obtuvieron de Avanti Polar Lipids Inc. El 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C-oleoil] PC se obtuvo de DuPont NEN. El plasma humano deficiente de factor V se obtuvo de George King Bio-Medical, Inc (Overlan Park).

Preparación de las vesículas fosfolípicas

Se prepararon las vesículas sonicadas como se describe en Smirnov (1994). Brevemente, se mezclaron los lípidos en las proporciones en peso que se describen a continuación, se secaron en atmósfera de argón y se liofilizaron durante la noche para eliminar los solventes orgánicos. Luego se reconstituyeron en 150 mM de NaCL, 20 mM de Tris-HCl, azida de sodio 0,02%, pH 7,4 (TBS) hasta alcanzar 2 mg/ml de lípidos totales, y se sonicaron (Bronson Sonic Power Co. modelo 350) durante 15 minutos en un baño de agua helada sometido a un flujo de argón, se cetrifugaron a 8000 g durante 15 min y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. Las vesículas se usaron inmediatamente o se almacenaron a +20°C. El almacenamiento no alteró la actividad de las vesículas.

Construcción de la proteína C quimérica con el dominio Gla de la protrombina

Se construyó la proteína C quimérica en la cual los tres primeros exones de la protrombina (o sea, los que codifican para el preprolíder, el dominio Gla y la región de apilamiento aromático) remplazaron a las regiones correspondientes de la proteína C.

Las secuencias aminoacídicas relevantes de la protrombina y la proteína C humanas son:

protrombina humana (ID. de secuencia No. 1):

ANTFL_xVRKGNL_xR_xCV_xTCSY_xAF_xAL_xSSTATDVF_xWAKYT

proteína C humana (ID. de secuencia No. 2):

ANSFL_xLRHSSL_xR_xCI_xICDF_xAK_xIFQNVDDTLAFWSKHV

donde x significa ácido carboxiglutámico.

Se llevó a cabo la mutagénesis mediante la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa. El ADNc de la proteína C de tipo salvaje (proporcionado por el Laboratorio de Investigaciones de Eli Lilly) se ligó a sitios HindIII y XbaI de pRc/RSV (Invitrogen, CA) para formar RSV-PC, como se describe en Rezaie (1993). Existe un único sitio de restricción de BstEII en el ADNc de la proteína C, en el comienzo del exón 4, que codifica para el dominio EGF N-terminal. La doble digestión de RSV-PC con HindIII y BstEII elimina las secuencias de and de los tres primeros exones de la proteína C, junto con el primer codón del exón 4, que codifica para un Asp. Para cambiar los exones uno a tres de la proteína C por los correspondientes de la protrombina, se sintetizaron dos cebadores de PCR. El cebador de sentido directo de la protrombina, 5'-CGCTAAGCTTCCATGGCCCCGCATCCGAGGCTT-3' (ID. de secuencia No. 3) comienza a partir del codón de iniciación del ADNc de la protrombina (proporcionado por el Dr. Ross MacGillivray) y contiene un sitio de restricción para la enzima HindIII en el extremo 5' del cebador (subrayado). El cebador inverso antisentido de la protrombina 5'-GAGTGGTCACCGTCTGTGTACTTGGCCCAACA-3' (ID. de secuencia No. 4)

ES 2 265 159 T3

comienza a partir del nucleótido del exón tres en el ADNc de la protrombina, y contiene el sitio de restricción nativo para la enzima BstEII que contiene al codón Asp perdido del exón 4 del ADNc de la proteína C.

5 A continuación de la amplificación por PCR del ADNc de la protrombina con estos dos cebadores, y la doble digestión con HindIII y BstEII, se ligó el fragmento de ADN entre los sitios idénticos del vector de expresión de la proteína C de tipo salvaje descrito antes.

10 Después de secuenciar, se transfectó la construcción mutante en células humanas 293 y se purificó la proteína quimérica C a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando el anticuerpo monoclonal dependiente de calcio, HPC4, como se describe en Rezaie y Esmon (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19943-19948, Rezaie, A.R. Y Esmon, C.T., 1992 *J. Biol. Chem.* **267**, 26104-26109). La quimera PC-PT Gla se activó a la forma APC-PT Gla mediante la trombina, en presencia de EDTA, 2 mM y se purificó mediante cromatografía Mono-Q FPLC (Pharmacia) esencialmente como se describe, para la proteína C de tipo salvaje, en Esmon, C.T. *et al.*, *Methods. Enzymol.*, **222**, 259-385 (1993).

15 Las determinaciones de residuos Gla las realizó las Dras. Betty Yan y Cindy Payne, del Laboratorio de Investigación de Eli Lilly. El contenido de Gla por mole de proteína obtenido fue: $8,7 \pm 0,3$ para la proteína C, $10,9 \pm 0,2$ para la protrombina, $9,5 \pm 0,2$ para PC-PT Gla y $10,3 \pm 0,4$ para APC-PT Gla.

20 Ejemplo 2

Determinación de la actividad de la proteína C quimérica

Métodos y materiales

25

Medición de la inactivación del factor Va y la actividad protrombinasa en el sistema purificado

30 Se analizó la inactivación del factor Va mediante un ensayo en tres etapas, como se describe esencialmente en Smirnov y Esmon (1994). Brevemente: en la primera etapa se inactivó el factor Va mediante APC o APC-PT Gla. En la segunda etapa, después de la inactivación de la enzima con (p-amidinofenil) metanosulfonil fluoruro, se monitoreó la actividad residual del factor Va a través de su actividad en el complejo protrombinasa, en presencia de un exceso de factor Xa y protrombina. Se midió la trombina resultante en la tercera etapa, mediante un ensayo cromogénico. Todos los reactivos se diluyeron en TBS conteniendo 1 mg/ml de gelatina, 1 mg/ml y 10 mg/ml de BSA (TBS-GOB). Se calculó el por ciento de inactivación del factor Va dividiendo la formación de trombina en presencia de APC por la formación de trombina en ausencia de la misma, y sustrayendo el cociente de 1.

35

Se añadió la enzima en concentraciones de 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,15, 1 y 4 ng/ml. Cuando se mantuvo constante, la concentración final de los reactivos fue 0,2 nM del factor Va, 1 nM del factor Xa, 1,4 μ M de protrombina y 10 μ g/ml de fosfolípidos.

40

Ensayos de coagulación

45 Se llevaron a cabo los ensayos de coagulación mediante una modificación de la prueba del veneno de víbora de Russell diluido. Se empleó X-CP purificado en lugar de veneno crudo. Todos los reactivos se diluyeron en TBS conteniendo 1 mg/ml de gelatina. Se llevaron a cabo los ensayos en placas de 96 pozos. A las diluciones seriadas de APC (30 μ l) se añadieron 10 μ l de fosfolípidos a 60 μ g/ml, 10 μ l de X-CP a 20 ng/ml y 10 μ l de plasma normal colectado. Toda la mezcla se incubó durante 1 min. Se inició la coagulación mediante la adición de 25 μ l de CaCl_2 a 20 mM. Se determinó el tiempo de coagulación en un Lector de microplacas Vmax Kinetic.

50

Adsorción de liposomas al látex

55 Se sedimentó una suspensión al 10% de cuentas de látex (50 μ l) en tubos de Eppendorf y se lavó tres veces con PBS mediante centrifugación a 8000 x g, durante 1 min y se resuspendió en 50 μ l de TBS, 5 mM de CaCl_2 . Se añadieron liposomas (100 μ l a 1 mg/ml de fosfolípidos totales en TBS) y se incubó durante 2 h a 37°C con agitación. Después de dos lavados, se resuspendieron las cuentas en TBS-GOB y se incubaron por otras 2 h a temperatura ambiente con agitación. Después de dos lavados adicionales con TBS, se resuspendieron las cuentas en 500 μ l de TBS. Se determinó la concentración total de fosfolípidos mediante conteo del trazador de ^{14}C -PC incluido en las mezclas de fosfolípidos (contador de centelleo Modelo Beckman LS 6000SE) y se encontró que era de 50 μ g/ml de la suspensión de látex para los liposomas adsorbidos, tanto de PS:PC, como de PE:PS:PC. Las cuentas pudieron almacenarse a 4°C durante al menos 7 días, sin pérdida de los fosfolípidos adsorbidos.

60

Marcaje fluorescente

65 Las enzimas marcadas con fluoresceína en el centro activo se prepararon de acuerdo al método de Bock (1988). Brevemente, a 300 μ l de enzima (1 mg/ml) se añadieron 40 μ l de HEPES, 1 mM, pH 7,4, 1 μ l de EDTA 0,2 μ l y, dos veces, 5 μ l de N^α -[(acetiltio)acetil]-D-Phe-Pro-Arg- CH_2Cl (4 mM), 10 min por incubación, para formar ATA-FPR enzima. Luego de una diálisis durante la noche, se añadieron 45 μ l de hidroxilamina (1 M en 1 M de HEPES, pH 7,4) y 50 μ l de 5-iodoacetamido-fluoresceína. Se añadieron sondas moleculares a 1 mg/ml en 1 M de HEPES, pH 7,4

a las ATA-FPR-enzimas y se incubaron durante 1 h a 0°C. Se eliminó la fluoresceína libre mediante filtración en gel en una columna de PD-10 (Pharmacia), y las muestras se dializaron a continuación durante la noche a 4°C. Con este método, cada molécula de enzima marcada contiene un único marcaje en la misma localización y, por tanto, todas las moléculas fluorescentes se comportan de la misma manera.

Unión de las proteínas marcadas con fluoresceína a los liposomas adsorbidos al látex

Los liposomas adsorbidos a las cuentas de látex (con 0,5 μg de fosfolípidos totales) se suspendieron en TBS-GOB que contenía 2,5 mM de CaCl_2 . Se añadieron las proteínas adecuadas a las concentraciones indicadas y se incubó durante 20 min a 25°C, en la oscuridad mezclando ocasionalmente. Se analizó la unión en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Para determinar el componente irreversible, independiente de calcio de la unión de APC fluorescente, se añadieron 50 mM de EDTA en 200 mM de MOPS, pH 7,4, para una concentración final de 10 mM, y se reanalizaron las muestras luego de 20 min de incubación en la oscuridad. Dicho componente era responsable de menos del 20% de la unión observada.

Se determinaron los parámetros de unión ajustando la unión dependiente de calcio a la ecuación correspondiente al modelo de unión de simple sitio usando el programa ENZFITTER™ (Ensevier Biosoft, Cambridge, RU).

Interacciones liposoma-proteína medidas mediante dispersión de la luz en ángulo recto

Se llevó a cabo la dispersión de la luz en ángulo recto como se describe en Nelsestuen (1978) y Castellino (Zhang y Castellino, 1993) usando un fluorímetro SLM 8000 (SLM Instruments, Urbana, IL) a una longitud de onda de 320 nm. La concentración de liposomas fue de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se llevaron a cabo experimentos de unión en TBS, a pH 7,4, conteniendo 5 mM de CaCl_2 . Las concentraciones de protrombina y proteína C se variaron entre 0 y 3 μM , y las concentraciones de PC-PT Gla se variaron de 0 a 1,2 μM . Se determinaron los parámetros de unión mediante el ajuste de la unión reversible dependiente de calcio a la ecuación para el modelo de sitio único utilizando el programa ENZFITTER.

Resultados

La PC-PT Gla pudo activarse para formar una enzima con actividad amidolítica con respecto a Spectrozyme PCA, equivalente a la APC de tipo salvaje. A continuación se comparó la dependencia con respecto a la concentración de la inactivación del factor Va de la APC quimera con respecto a la APC, en vesículas con o sin suplementación de PE. En vesículas compuestas únicamente por PS:PC, la quimera fue al menos 5 veces más activa que la APC de tipo salvaje. PE incrementó muy poco la inactivación del factor Va por parte de la quimera (alrededor de 1,6 veces en este experimento), en comparación con aproximadamente un aumento de 15 veces de la APC. Además, la proteína S (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína S) inhibió la inactivación del factor Va por la quimera, mientras que la proteína S estimuló la inactivación del factor Va por la APC. Estos efectos no fueron dependientes de PE. Por tanto, parece que gran parte de la dependencia de PE de la APC está mediada por el dominio Gla y que alguna porción del dominio Gla es importante para los efectos mediados por la proteína S en los sistemas purificados.

Para determinar si las diferencias en actividad se reflejaban en diferencias en las afinidades de unión a las membranas se llevaron a cabo, inicialmente, experimentos de dispersión de luz con protrombina, proteína C y PC-PT Gla en vesículas de PS:PC que contenían 20 o 50% de PS. La protrombina, la proteína C y la PC-PT Gla se unieron a liposomas (liposomas 20% PS:80% PC) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en TBS, pH 7,4 que contenían CaCl_2 5 mM. Se midió la unión de proteínas mediante la dispersión de luz en ángulo recto.

Resultó evidente que la cantidad de protrombina unida a las vesículas que contenían 20% de PS era mucho mayor que la cantidad de proteína C unida, siendo la PC-PT Gla algo superior a la proteína C. Los valores de K_d fueron similares para todas las proteínas. El incremento de la concentración de PS a 50% incrementó la cantidad de proteína C y proteína quimérica unida en más de dos veces, pero tuvo un efecto relativamente pequeño sobre la unión de protrombina. De estos experimentos resulta evidente que la PC-PT Gla se una a la membrana al menos tan bien como la proteína C, pero la afinidad no es significativamente mejor que la del tipo salvaje y, por tanto, no puede ser responsable del incremento de la actividad en las vesículas de PS. Las diferencias en la unión máxima entre la proteína C y la protrombina, presumiblemente, reflejan el máximo número de moléculas unidas por liposoma, y la masa molecular, aproximadamente 20% mayor de la protrombina.

Resulta posible que las diferencias en actividad entre el tipo salvaje y la proteína quimérica reflejen diferencias en la interacción con otros componentes proteicos y, por tanto, no se puedan emplear con facilidad las estrategias de dispersión de la luz. Además, las vesículas que contienen PE son demasiado grandes para utilizarlas en estrategias de dispersión de la luz. Por tanto, fue necesario utilizar diferentes metodologías de unión que permitiesen la presencia de PE y/o otros componentes proteicos. Esto se consiguió mediante citometría de flujo. Se utilizaron los liposomas adsorbidos al látex, y se midió la unión como una función del incremento de la concentración de enzima fluorescente. La concentración final de fosfolípidos fue 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, en los casos en que estuvo presente, la de la proteína S (pro S) fue de 100 nM, y la del factor Va (FVa), 10 nM. Todas las mediciones de citometría de flujo se realizaron con las enzimas marcadas en el sitio activo con fluoresceína. Todos los experimentos de dispersión de luz se llevaron a cabo con los cimógenos, excepto en el caso de los experimentos con la meizotrombina, en los cuales la actividad enzimática se bloqueó con D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona como está descrito en Armstrong *et al.*, 1990. En las

vesículas de PS:PC, la dependencia de la concentración de la unión de proteína C, determinada mediante dispersión de luz, y la dependencia de la concentración de la unión de APC a las vesículas adsorbidas al látex fueron indistinguibles, validando, de esta manera, dicha metodología. Los datos obtenidos de las mediciones de dispersión de luz y de los análisis de citometría de flujo se plotearon como una función de las concentraciones crecientes de proteína. Las curvas se superpusieron luego de normalizar las curvas con respecto al máximo valor de unión calculado con el programa Enzfitter, asumiendo un único tipo de sitios de unión. Los valores de Kd para la protrombina y la meizotrombina fueron similares también a los determinados mediante la dispersión de la luz, y la unión de la meizotrombina fue equivalente por ambos métodos, lo que sirvió como validación adicional de esta estrategia.

La característica principal que distingue a la proteína de tipo salvaje de la APC-PT Gla es el grado con el cual la proteína S y el factor Va actúan de manera sinérgica para incrementar la unión a la membrana. La comparación de la APC salvaje y la quimérica muestra que la afinidad de unión de la APC de tipo salvaje es mayor que la de la quimérica a vesículas que contienen PE cuando se encuentran presentes tanto el factor Va, como la proteína S y es más débil cuando se mide con respecto a fosfolípidos carentes de PE. El factor Va solo, y la proteína S sola tuvieron relativamente poca influencia sobre la afinidad de unión de la APC de tipo salvaje, pero el factor Va, por sí solo, estimuló la unión de la proteína quimérica en mucho mayor grado que la proteína de tipo salvaje, especialmente en ausencia de PE.

A continuación se estudió su capacidad de anticoagular el plasma, para determinar si dichas diferencias en las propiedades entre la APC y la proteína quimérica se mantenían bajo más condiciones fisiológicas. Resulta sorprendente que la proteína quimérica exhibió una actividad anticoagulante muy superior a la de la APC, en vesículas con o sin PE.

A diferencia de lo que sucede con las proteínas purificadas, en el plasma, la proteína quimérica fue mucho más activa que la APC de tipo salvaje en vesículas que contenían PE.

La muy superior actividad anticoagulante de la proteína quimérica en el plasma puede deberse tanto a la ocurrencia de interacciones específicas de la proteína quimérica como a, más probablemente, resistencia a factores inhibitorios. Un posible inhibidor es la protrombina, que circula a muy altas concentraciones. En principio, la protrombina puede interferir con la APC de manera más efectiva que con la quimera. Para probar esta posibilidad y los efectos potenciales de la proteína S sobre dicha interacción, se analizó la inactivación del factor Va como sigue: se definió como condición estándar la inactivación del factor Va por la APC que ocurre en 30 minutos en presencia de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de proteína S en vesículas de PS:PC. A la concentración de APC requerida para la inactivación del 50% del factor Va bajo condiciones estándar se le asignó una actividad relativa de 1. Se determinó, a continuación, la concentración de APC o proteína quimérica requerida para inhibir 50% del factor Va bajo varias condiciones experimentales (\pm protrombina, \pm proteína S, \pm PE en las vesículas) en la primera etapa del ensayo. Se dividió este valor por la concentración de APC que determina las condiciones estándar para calcular la actividad relativa.

Se llevó a cabo la inactivación del factor Va de la manera usual, con la excepción de que se añadió 1,4 μM de protrombina en la primera etapa de los ensayos. Se emplearon tres concentraciones de proteína S: 0 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$. Los lípidos utilizados fueron PS:PC o PE:PS:PC. Se calculó la actividad relativa como se describió anteriormente. La comparación de la inactivación del factor Va en ausencia y en presencia de protrombina indicó que la protrombina inhibió la inactivación por parte de la APC del factor Va en ambos tipos de vesículas, e independientemente de la presencia de la proteína S. La protrombina inhibió la inactivación del factor Va cinco veces en ausencia de PE, y casi 100 veces en presencia de PE. En contraste con esto, la proteína quimérica fue mucho menos sensible a la protrombina, con inhibición de alrededor de 5 veces observada en presencia o ausencia de PE. Esta disminución en la sensibilidad a la inhibición por protrombina puede explicar en parte la actividad anticoagulante plasmática incrementada de la proteína quimérica.

Ejemplo 3

Uso de la proteína quimérica como reactivo de investigación

En el plasma, la proteína S desempeña papeles adicionales en la actividad anticoagulante de la APC. Por ejemplo, estudios previos han mostrado que la proteína S puede bloquear la capacidad del factor Xa de proteger al factor Va (Solymoss *et al.*, 1998 *J. Biol. Chem.* **263**, 14884-14890) de la inactivación, y que la proteína S puede interferir directamente con el ensamblaje del complejo de la protrombinasa (Heeb *et al.*, 1993 *J. Biol. Chem.* **268**, 2872-2877).

Para probar la posibilidad de que una o más de dichas influencias de la proteína S se observaran con la proteína quimérica en vesículas con PE, se bloqueó la proteína S con un anticuerpo monoclonal inhibitorio y se examinaron las actividades anticoagulantes de la proteína C activada y la proteína quimérica en el plasma. Se llevó a cabo la coagulación del plasma bajo condiciones estándar en presencia y ausencia de un anticuerpo monoclonal inhibitorio anti-proteína S (300 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo monoclonal inhibitorio anti-proteína S, S155, presentes en la mezcla final de coagulación).

En el plasma, la actividad anticoagulante de la proteína quimérica permaneció relativamente insensible a la proteína S (o sea, la actividad anticoagulante no fue afectada por el anticuerpo en vesículas carentes de PE (liposomas 20%PS:80%PC) y solo ligeramente en vesículas que contenían PE (liposomas 50%PE:20%PS:30%PC)). A diferencia

ES 2 265 159 T3

de la proteína C activada, la actividad anticoagulante fue independiente de la proteína S. Por tanto, las funciones de la proteína S en el plasma, aparentemente, dependen sobre todo de propiedades que le son conferidas por el dominio Gla de la proteína C.

5 Ejemplo 4

Inactivación del factor Va de Leiden utilizando proteína C quimérica

10 Se probó la actividad anticoagulante de la proteína quimérica en plasma normal y con factor V de Leiden. Se determinó la coagulación del plasma con las siguientes cantidades de reactivos: 20 microlitros de APC o proteína quimérica para producir concentraciones finales de ensayo que se muestran en la figura, 10 microlitros de fosfolípidos a 0,1 mg/ml (50% de fosfatidil etanolamina: 20% de fosfatidilserina: 30% de fosfatidilcolina), 10 microlitros de la enzima activadora del factor X proveniente de veneno de víbora de Russell a 0,05 microgramos/ml, 20 microlitros de plasma normal o plasma de Leiden, y se inició la reacción de coagulación mediante la adición de 20 microlitros de 15 CaCl_2 a 20 mM. Se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente y se monitoreó la coagulación en un lector de placas de cinética de Vmax.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Como muestra la figura, con la proteína quimérica, el tiempo de coagulación del plasma de Leiden se incrementó casi linealmente desde 23 segundos sin APC hasta 45 segundos con la 20 proteína quimérica a 1 microgramo/ml (triángulos rellenos). Por el contrario, se necesitaron 10 microgramos/ml de APC nativa para producir una respuesta anticoagulante comparable en el plasma de Leiden (círculos rellenos). Para fines de comparación, se muestra también la respuesta del plasma normal a la APC (círculos vacíos) o a las proteínas quiméricas. Como se mostró con anterioridad, la proteína quimérica es más activa que la APC en el plasma normal.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una composición que incluya a una proteína C quimérica en la cual la región del ácido gamma carboxiglutámico de la proteína C ha sido reemplazado por la región del ácido gamma carboxiglutámico de la protrombina, en la construcción de un medicamento para el tratamiento de un paciente con deficiencia de la proteína S, para tratar un paciente de Factor V de Leiden, para tratar un paciente con anticoagulantes de lupus, o para modular la respuesta inflamatoria que involucra a la proteína C y que es activada por la proteína C.

10 2. El uso de la reivindicación 1 en el cual la proteína quimérica, además contiene la región de apilamiento helicoidal de la protrombina.

3. El uso de la reivindicación 2 en el cual los aminoácidos del 1 al 45 de la proteína C son reemplazados por los aminoácidos del 1 al 45 de la protrombina.

15 4. El uso de la reivindicación 1 en el cual la proteína C y la protrombina son proteínas humanas.

5. El uso de la reivindicación 1 en el cual el paciente tiene factor Va de Leiden.

20 6. El uso de la reivindicación 1 en el cual el paciente tiene deficiencia de proteína S.

7. El uso de la reivindicación 1 en el cual el paciente tiene anticoagulantes de lupus.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

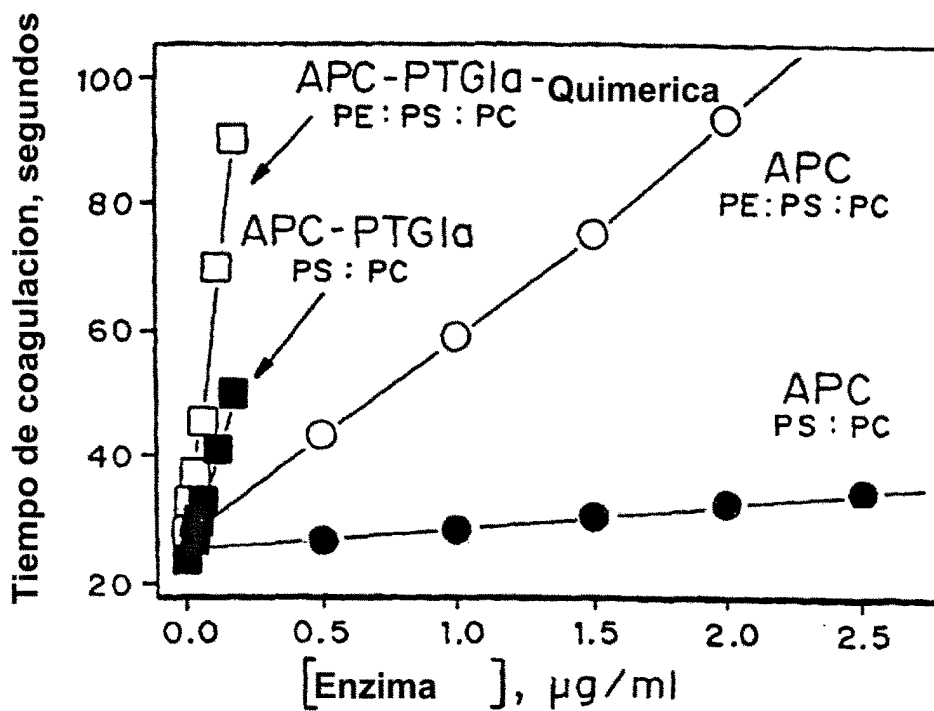


FIG. 1

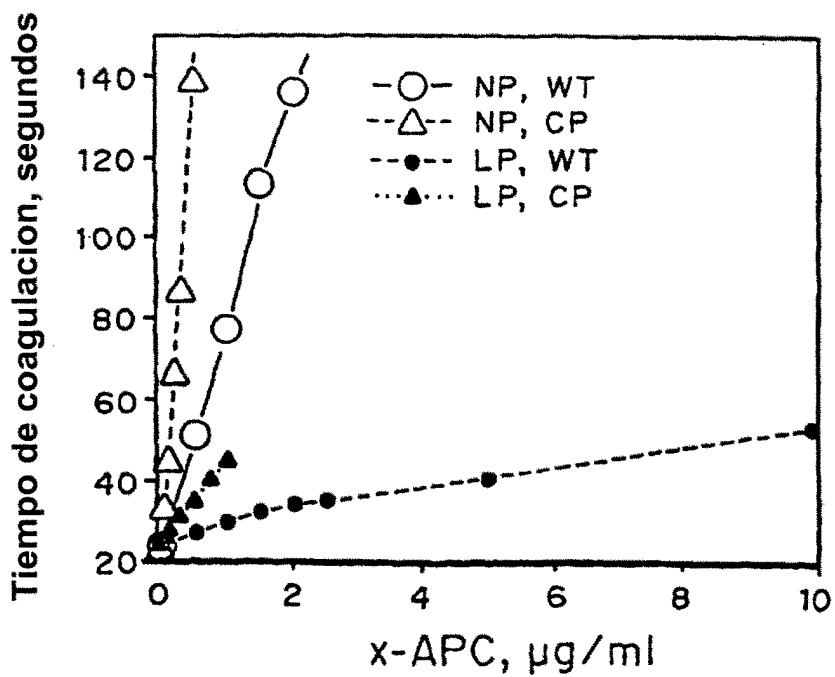


FIG. 4

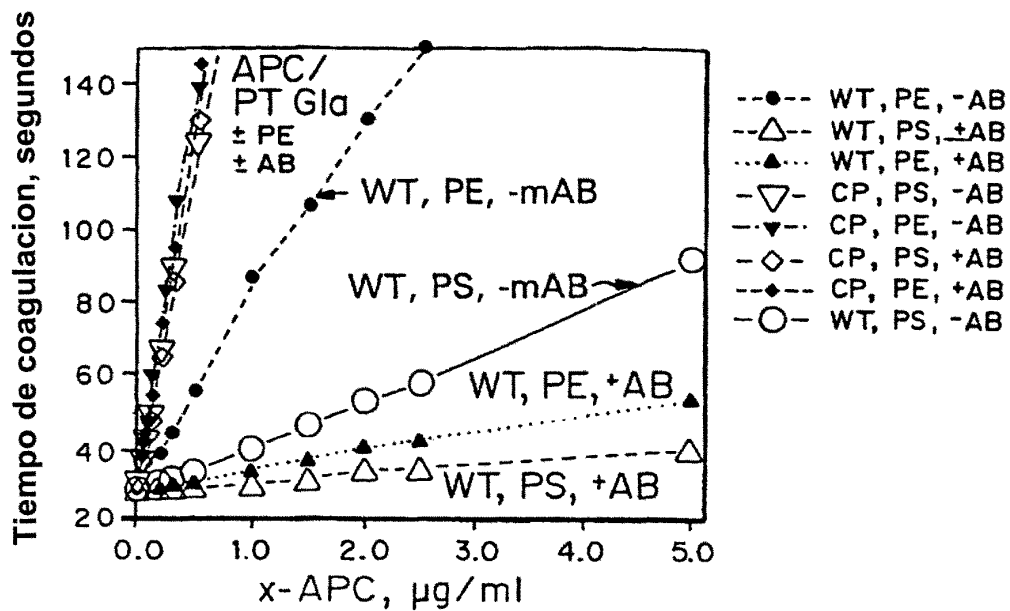


FIG. 2A

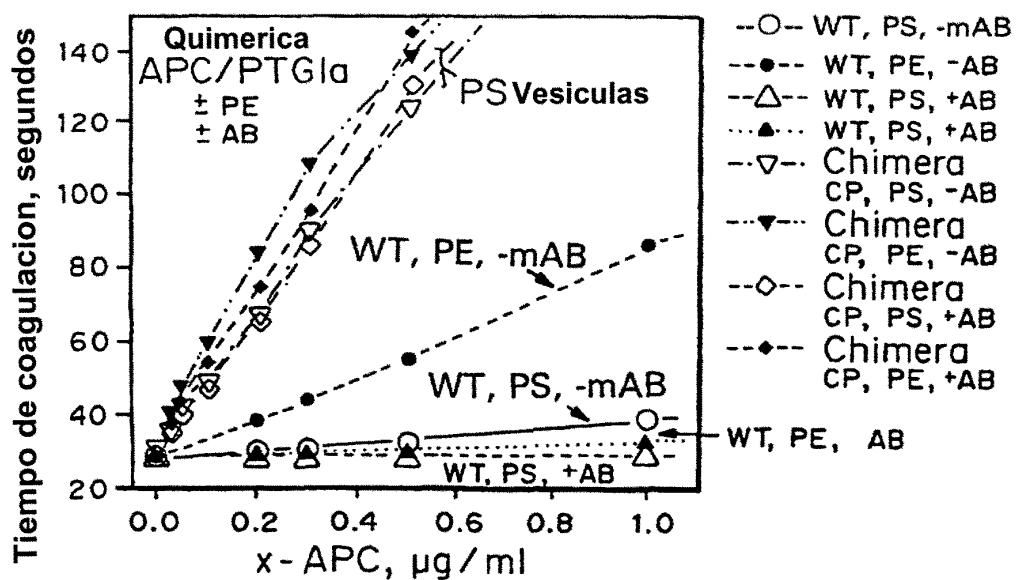


FIG. 2B

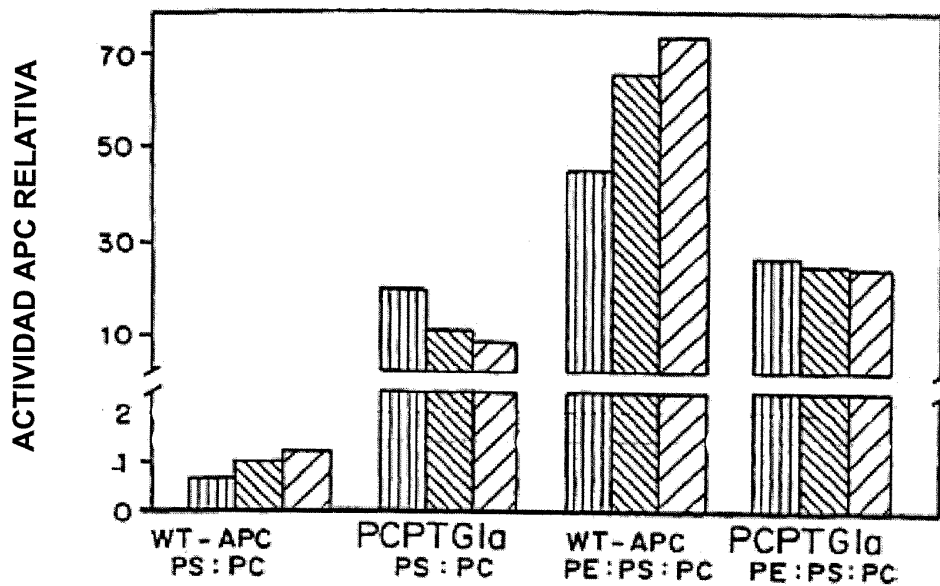


FIG. 3A

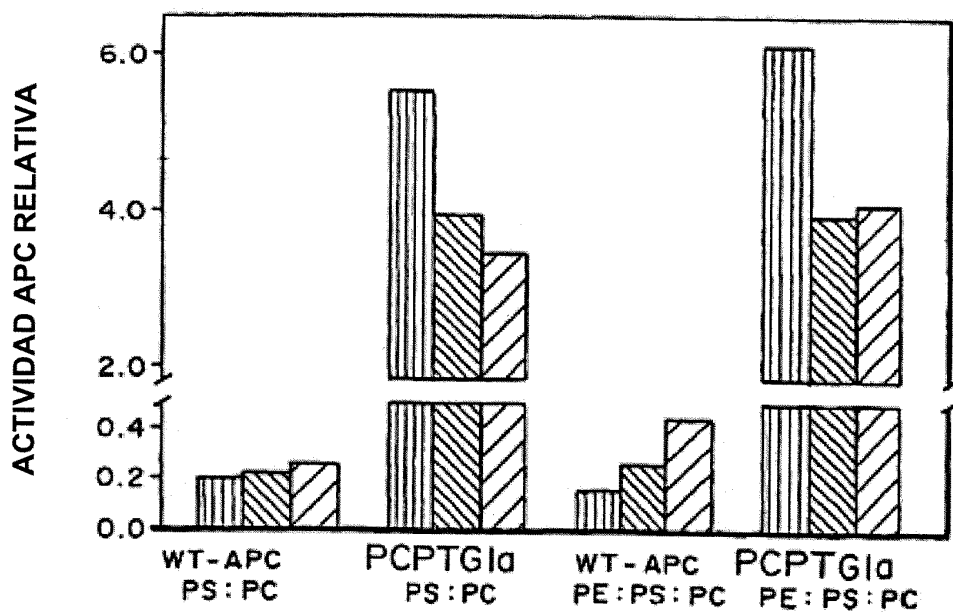


FIG. 3B

ES 2 265 159 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (I) SOLICITANTES: Oklahoma Medical Research Foundation
- (II) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Proteína C modificada
- (III) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 10 (IV) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) CONTACTO: Patrea L. Pabst
- (B) CALLE: 2800 One Atlantic Center, 1201 West Peachtree Street
- 15 (C) CIUDAD: Atlanta
- (D) ESTADO: Georgia
- (E) PAÍS: Estados Unidos de América
- 20 (F) ZIP: 30309-3450
- (V) FORMULARIO LEGIBLE EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patente solicitada #1.0 Versión #1.25
- (VI) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD
- 30 (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: PCT/US97/
- (B) FECHA DE ENVÍO: 7-NOV-1997
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (VII) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: 08/745,254
- (B) DÍA DE ENVÍO: 8-NOV-1996
- 40 (VII) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: 08/745,254
- (B) DÍA DE ENVÍO: 8-NOV-1996
- 45 (VII) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: 08/745,254
- (B) FECHA DE ENVÍO: 8-NOV-1996
- 50 (VII) DATOS DE APLICACIÓN ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: 60/053,768
- (B) FECHA DE ENVÍO: 25-JUL-1997
- 55 (VIII) INFORMACIÓN DE AGENTE/ABOGADO:
- (A) NOMBRE: Pabst, Patrea L.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 31,284
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE MINUTA: OMRF 165/167
- 60 (IX) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN
- (A) TELÉFONO: (404)-873-8794
- (B) TELEFAX: (404)-873-8795

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC NO: 1:

- (I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 265 159 T3

- (A) LONGITUD: 32 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: SIMPLE
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(II) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(IX) CARACTERÍSTICA:

10

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(B) OTRA INFORMACIÓN: /nota="cebador de sentido directo de la protrombina, con sitio adaptador de restricción"

15

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: ID SEC. NO:3:

CGCTAAGCTT CCATGGCCCG CATCCGAGGC TT

32

20

2. INFORMACIÓN SOBRE LA ID SEC NO: 4:

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 34 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(II) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(IX) CARACTERÍSTICA:

35

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(B) OTRA INFORMACIÓN: /nota="cebador de sentido inverso de la protrombina"

40

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: ID SEC. NO:4:

CAGTGGTCAC CGTCTGTGTA CTTGGCCAG AACA

34

45

50

55

60

65